秋田県衛生科学研究所報 No.21. 75～78 (1977)

「かも」からのインフルエンザウイルスの分離（第1報）

森田盛大* 佐藤宏康* 原田誠三郎*
庄司キク* 高山和子* 山脇徳美*
奈良篤子* 天野保二** 石田名香雄***

I はじめに

10数年毎に大流行（pandemic）をくり返しているA型インフルエンザウイルスの発生機序に関しては抗循環説的な考え方や遺伝的再結合によるとする考え方があるが，前者の場合には少なくとも非流行期におけるウイルスの行方が明らかにされねばならない，又，後者の場合には，人に起病性をもち且つ流行性を有するインフルエンザウイルスが動物や鳥類にキャリヤーされているウイルスの間でまたはかっての人流行株ウイルスとの間で如何なる機序と頻度で遺伝的再結合を起すのかが説明されなければならない。R.G.webster らはこの遺伝的再結合説にアプローチしてかなりの実証的な根拠を in vitro や in vivo であげつつある。

しかし，いずれの説にしろ，流行ウイルス pandemic strain の出現機序に自然界の動物や鳥類の保有するインフルエンザウイルスが関与していることはほぼ間違いないことであろう。このような意味において，我々は自然界におけるA型インフルエンザウイルスの抗原数を明らかにし且つ将来の流行ウイルスの存否を確めるため鳥類や動物の保有するA型インフルエンザウイルスの分離に着手した。

そして，大陸間を季節的に往来する「かも」—その行動半径のひろがりが自然界でのウイルスの運搬又は交流に格好—を第1の検索対象とした。

本報は，先に行なった webster らとの共同研究をふまえて，1976年において行なった「かも」からのA型インフルエンザウイルスの分離状況について概略報告することとしたい。

II 調査方法

A. かもからのウイルス分離材料採取

1976年11月15日（かも狩猟開禁日）表1.に示す，県内4地区（北秋田郡田代町岩瀬，能代市落合，南秋田郡八郎潟，平鹿郡山内村）で射殺した「かるがも」197羽，「まがも」9羽，「おながかも」1羽から気管擦過液と肛門拭液を採取しウイルス分離材料とした。採取液は牛血清アルブミンを0.1%の割合に加えたSLEにストレプトマイシン500γ/mℓ，ペニシリン500u/mℓ，ナイアシン100γ/mℓを加えたものを用いた。分離材料はすべて被検時迄−70°Cに保存した。

表1. 被検「かも」の種類と採取地

かもの種類 / 採取地	かるがも Anas polecilorhyca	まがも Anas platyhynchos	おながかも Anas acuta	計
山内村	108 (7)	1	1	110
能代市落合	69 (4)	8		77
八郎潟	13 (2)			13
田代町岩瀬	7			7
計	197 (13)	9	1	207

（ ）内はHA活性を示してウイルス分離陽性となった羽数を示す。

B. ウイルス分離方法と同定方法

ウイルス分離材料は被検時に 3,000rpm，10分間遠心し，その上清を卵令10の受精卵（1個/1検体）の尿膜腔内に0.1mℓずつ接種した。35°Cで48時間培養後尿膜腔液を採取して HA（ニワトリ赤血球凝集）活性を観察した。HA 活性陽性の場合，卵尿膜腔内に継代して HA 価とノイラミンダーゼ活性を測定した。又，尿膜を採取して粗CF—S抗原を調整した。

赤血球凝集抑制（HAI）試験には，抗A／熊本／2／65，抗A／愛知／2／68，抗A／port chalmers／1／73，抗A／victoria／3／75の各ニワトリ免疫血清，東芝北学工業KK 製の抗パラインフルエンザ1型，2型3型の各抗血清及び抗 NDV 血清，並びに「かも」からの分離株によって作成した抗D—63，抗D—310，抗D

*秋田県衛生科学研究所 **秋田大学医学部研究機器センター ***東北大学医学部細菌学教室

—311，抗D—347兎血清をRDE処理して用いた。尚，免血清はRDE処理後ニワトリ血球で吸収した。補体結合試験には，A/Eguine—I/prague/1/56経鼻感染2ケ月後にA/port chalmers/1/73株5,000 HAU/0.5mℓ筋肉内に追加免疫したハムスター血清と対照のハムスター血清を用いた。これらのHA，HAI及びCF試験はすべてマイクロタイター法によって行なった。

C．電子顕微鏡による形態学的観察

尿膜腔内で4代継代したD—63，D—310，D—311及びD—347の4株を次のステップをふんだ後電子顕微鏡によりその形態像を観察した即ち，夫々低速遠心→その上清を4°Cに冷却後ニワトリ血球を加えて1時間吸着→4°C，2,500rpm，10分遠心→沈渣の赤血球をRDFを1/10量加えた小量のマイナスPBS (Ca, Mg free) に再浮遊し37°Cで2時間(15分毎撹拌)インキューベート→室温，2,500rpm，10分遠心→上清を4°C 18,000rpm，120分間遠心→ペレットを数滴の—PBSに溶解→ネガテイブ染色法により電顕観察，というステップである。

Ⅲ 成　　績

ウイルス分離に供した検体は表1.に示す207羽のかもから採取した気管擦過液と肛門拭液であるが，ウイルス分離の結果HA活性を示したのは表2.に示す如く13検体であった。すなわち，「かるがも Anas polecilorhyca」の気管擦違液から3検体（分離率　%）及び肛門拭液から10検体（分離率　%）がHA陽性であった。他の「ま

表2．各採取材料からのウイルス分離(HA活性陽性)成績

ウイルス分離 / 採取地	気管拭液 被検数	分離陽性数	分離率%	総排出腔(Cloaca)拭液 被検数	分離陽性数	分離率%	計 被検数	分離陽性数	分離率%
山内村	110	1	0.9	110	6 (1)*	5.5	220	7	3.2
能代市落合	77	1	1.3	77	3 (2)**	3.9	154	4	2.6
八郎潟	13	1	7.7	13	1 (1)***	7.7	26	2	7.7
田代町岩瀬	7	0	0	7	0	0	14	0	0
計	207	3	1.5	207	10	4.8	414	13	3.1

（　）内はA型インフルエンザウイルスと同定された株数を示し，株名は次の如くである。

*Strain A/duck/Akita/63/76.

**Strain A/duck/Akita/310/76 and strain A/duck/Akita/311/76

***Strain A/duck/Akita/347/76

いずれも「かるがも」から検出

がも Anas platyrhynchos」及び「おながかも Anas acuta」からはHA活性を示すものは全く検出されなかった。

HA活性を示した13株の内，現在迄にA型インフルエンザウイルスと同定されたのは表3.に示す4株であった（他の9株は未同定のため第2報において報告する。）即ち，この4株は尿膜腔内で2代継代した時表3.に示す

表3．かも由来分離株のHA活性とノイラミンダーゼ活性

Isolate	HA titer (HAU/ml)	Neuraminidase activity (units/0.05mℓ)
D-63	2^9	$10^{1.60}$
D-310	2^8	$10^{1.45}$
D-311	2^8	$10^{1.10}$
D-347	2^9	$10^{1.65}$

*passaged history : 2nd in allantoic cavity.

HA活性とノイラミンダーゼ活性を示した。人由来のA型インフルエンザウイルス，パラインフルエンザウイルス及びNDVの各抗血清によってHAIテストを行なった結果，表4.に示す如く，D-310とD-311の2株のHA活性が抗A/portchalmers/1/73血清で阻止されたが，他の2株はいずれの抗血清によっても阻止されなかった。次に，この4株を夫々兎に免疫して作成した各抗血清を用いて交叉HAIテストを行なった結果，表5.に示す如く，D-63とD-347の2株，D-310とD-311の2株がそれぞれ同じHAI態度を示した。即ち，D-63株はD-347株と，又，D-310株はD-311株とヘモアグルチニンが同一であることがわかった。

表4．かも由来分離株の各抗血清に対する被HAI態度

Antisera \ Isolates	D-63	D-310	D-311	D-347
A/Kumamoto/2/65	—	—	—	—
A/Aichi/2/68	—	—	—	—
A/PortChalmers/1/73	—	64	64	—
A/Victoria/3/75	—	—	—	—
Parainfluenza-1	—	—	—	—
〃 2	—	—	—	—
〃 3	—	—	—	—
NDV	—	—	—	—

次に，この4株と対照の2株のヒト由来ウイルスの粗CF—S抗原を作成してA/Eguine-1/Prague/56感染

表5. かも由来分離株間における交叉HAI試験成績

antisera \ antigens	D-63	D-310	D-311	D-347
D- 63	512	<32	<32	512
D-310	<32	1024	1024	<32
D-311	<32	1024	1024	<32
D-347	512	<32	<32	512

免疫ハムスター血清のCF－S抗体価を測定した結果表6.に示す如く，B型株を除きすべて8倍の抗体価を示し

表6. かも由来分離株などから調整した粗CF-S抗原のハムスター感染（A/Eg-1/prague/56）血清に対するCF態度

Crude CF-S antigens \ Antiserum	CF antiboby titers	
	anti-A/Eg-1/Prague/58*	control**
A/Aichi/2/68	8	< 4
B/Kanagawa/2/76	< 4	< 4
D- 63	8	< 4
D-310	8	< 4
D-311	8	< 4
D-347	8	< 4

*A/Eguine-1/Prague-56株で経鼻感染後2ヶ月目にA/PortChalmers/1/73株を5,000HAU/0.5mℓ追加免疫（筋肉内経路）したハムスター血清
**正常ハムスター血清

た。つづいて，この抗血清の2単位を用いて，分離株の粗CF－S抗原価を測定した結果，表7.の如く，いずれ

表7. 抗A/Eguine-1/prague/56ハムスター血清による「かも」由来粗CFS抗原価の測定

antisera (2units) \ crude CF-S antigens	CF-S antigen titers				
	B/K /2/76	D-63	D-310	D-311	D-347
anti-A/PC/73	<8	≧128	≧128	≧128	≧128
control	<8	< 8	< 8	< 8	< 8

も128倍以上の抗原価を示した。しかし，同時に行ったパラインフルエンザウイルス及びB型インフルエンザウイルスのS抗原価はこの抗血清によって検出されなかった。このS抗原の態度から，上記4株は血清学的にはA型インフルエンザウイルスであると推定した。又，形態学的にも，図1. 2. 3. 4. の如く，インフルエンザウイルスの形態像を示した。尚，ポリアクリルアマイドゲル電気泳動パターン及びHAとノイラミンダーゼの同定成績については第2報で報告する。

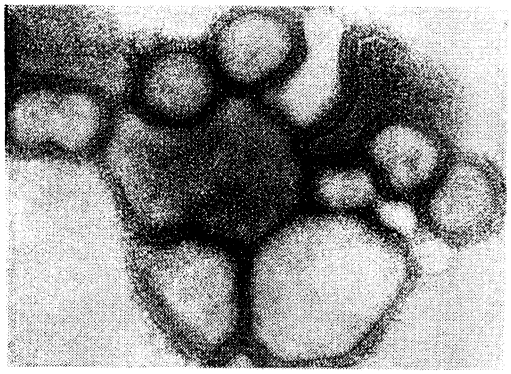


図1. D-63 株 の 電 顕 像

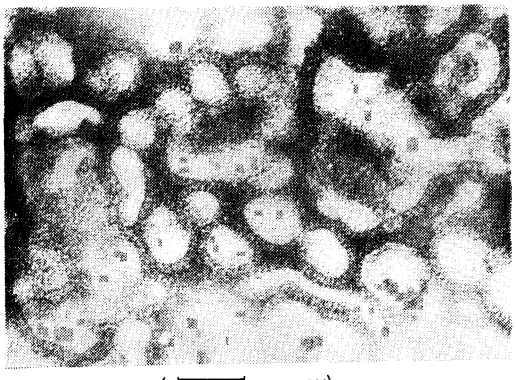


図2. D-310 株 の 電 顕 像

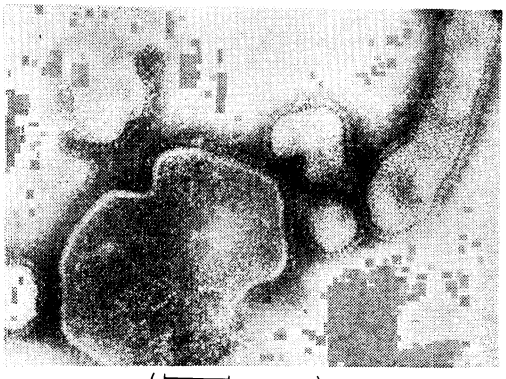
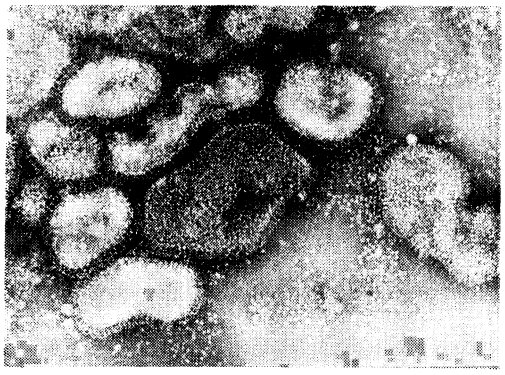


図3. D-311 株 の 電 顕 像



(100nm × 200,000)

図4.　　D-347 株 の 電 顕 像

Ⅳ 結　　論

1976年11月15日，県内4地区で採取した「かもの気管擦過液と肛門拭液各207検体からウイルス分離を行なった結果，前者から3株と後者から10株のHA陽性株が検出されたが，この内4株がA型インフルエンザウイルスと推定された。

稿を終えるにあたり，本調査に御協力下さいました秋田県狩猟協会及び会員の方々，県林政課藤岡浩技師，自然保護課近江吉雄課長補佐，秋田農林事務所，北秋田農林事務所，能代農林事務所及び平鹿農林事務所の関係者の方々に心から感謝します。

文　　献

1) Webster, R.G., et al., Ortho- and paramyxoviruses from migrating feral ducks : Characteriz ation of a new group of influenza A viruses, J. gen. Virol., 32, 217-225 (1976)